

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

Janek Urvik

Oksüdatiivse seisundi markerite varieeruvus kalakajakal
(*Larus canus*): seosed vanuse ja suremusega

Magistritöö

Juhendaja: PhD Tuul Sepp

TARTU 2014

Sisukord

1. Sissejuhatus	3
1.1 Oksüdatiivne stress	3
1.2 Oksüdatiivne stress ökoloogias	3
1.3 Oksüdatiivse stressi roll vananemises	4
1.4 Oksüdatiivse stressi seosed kohasusega: ülevaade uuringutest	5
1.5 Oksüdatiivse stressi mõõtmine ja sellega seotud probleemid	8
1.6 Töö eesmärgid	9
2. Materjal ja meetodid	10
2.1 Uuritav populatsioon	10
2.2 Mõõdetud parameetrid	10
2.2.1 Kohasuse parameetrid	10
2.2.2 Biokeemilised analüüsid	11
2.3 Statistilised meetodid	13
3. Tulemused	15
4. Arutelu	23
5. Kokkuvõte	28
6. Summary	29
7. Tänuavaldused	30
8. Kirjandus	31

1. Sissejuhatus

1.1 Oksüdatiivne stress

Evolutsiooniline ökoloogia on viimastel aastakümnetel üha enam muutunud mehhanismipõhiseks – püütakse leida füsioloogilisi mehhanisme, mis vahendavad elukäigu lõivsuhteid. Sellest lähtuvalt on ökoloogide huviorbiiti tõusnud reaktiivsete osakestega seotud protsessid organismis (McGraw *et al.* 2010). Reaktiivsed osakesed on kas vabad radikaalid (paardumata elektronidega molekulid) või molekulid, mis teiste ainetega reageerides toodavad vabu radikaale. Aeroobse ainevahetuse käigus tekib reaktiivseid osakesi pidevalt. Peamiseks reaktiivsete osakeste tekkekohaks on mitokondrid, kus radikaalid võivad lekkida elektronide transportahelast oksüdatiivsel fosforüleerimisel (Garratt ja Brooks 2012).

Reaktiivsed osakesed on väikeses koguses vajalikud, vahendamaks paljusid bioloogilisi protsesse, nagu immuunkaitse, kasv ja areng, ning apoptoos (Dowling ja Simmons 2009). Seetõttu toodetakse neid väikeses koguses ka kontrollitult, enamasti spetsiaalsete ensüümide poolt, nagu NADPH oksüdaas (Monaghan *et al.* 2009). Kui reaktiivsete osakeste tootmist ja neutraliseerimist kontrollivad süsteemid aga oma tööga toime ei tule, viib reaktiivsete osakeste kontrollimatu tootmine biomolekulide kahjustumiseni, mis võib häirida rakufunktsioone ja põhjustada isegi surma (Halliwell ja Gutteridge 2007). Sellist seisundit nimetatakse oksüdatiivseks stressiks (OS) (Halliwell ja Gutteridge 2007). Seepärast on loomadel mitmeid füsioloogilisi mehhanisme, mis neid reaktiivsete osakeste vastu kaitsevad. Nende seas on ensüümid nagu superoksiidi dismutaas ja glutatiooni peroksüdaas, aga ka mitte-ensümaatilised antioksidandid nagu glutatioon ja vitamiin E (Garratt ja Brooks 2012).

1.2 Oksüdatiivne stress ökoloogias

Kuna oksüdatiivse stressi kontrollimine on organismi tervise seisukohalt hädavajalik, võib optimaalne elukäik sõltuda ressursside paigutamisest oksüdatiivse stressi vastu võitlemise ja teiste elukäigutunnuste vahel (Monaghan, *et al.* 2009). Seetõttu peetakse oksüdatiivset stressi üheks peamiseks elukäigu lõivsuhteid tekitavaks füsioloogiliseks mehhanismiks, mis mõjutab paljusid tunnuseid, sealhulgas kasvukiirust, sigimist ja eluiga (von Schantz *et al.* 1999, Dowling ja Simmons 2009, Metcalfe ja Alonso-Alvarez 2010, Garratt ja Brooks 2012).

Oksüdatiivne stress võib olla ka vahend sugulise valiku teel välja kujunenud signaalide aususe tagamiseks, ühendades seega sekundaarsed sugutunnused geneetilise varieeruvusega isendite kohasuses (Von Schantz *et al.* 1999). Signaali ausust on võimalik säilitada juhul, kui

kõrge ja madala kohasusega isendid erinevad üksteisest füsioloogilise seisundi poolest. Madalama kvaliteediga signaalseerija kas ei suuda signaaltunnust tekitada ja säilitada või on signaalseerimisel tema jaoks kõrgem hind (Garratt ja Brooks 2012). Von Schantzi teooria põhineb mitmel eeldusel. Emased isendid võivad parandada järglaste ellujäämust, valides oma partnereid sekundaarsete sugutunnuste alusel, mis signaalseerivad usaldusväärselt nende tervislikku seisundit. Selliste sugutunnuste avaldumine on tundlik oksüdatiivse stressi suhtes. Organismi vastupanuvõime oksüdatiivsele stressile on aga päritav (Dowling ja Simmons 2009).

Reaktiivsete osakeste tekkes on oluline roll ka immuunsüsteemil. Kaasasündinud immuunsuse tagavad rakud, mis kaitsevad organismi reaktiivsete osakeste abil. Need rakud toodavad reaktiivseid osakesi oksüdatiivse purskena, mis hävitab patogeeni, kahjustades selle biomolekule (Freitas *et al.* 2009). Reaktiivsed osakesed pole aga patogeeni-spetsiifilised ning võivad kahjustada ka organismi ennast (Halliwell ja Gutteridge, 2007). Immuunsüsteemi aktiveerimisega kaasneb seega kõrgendatud reaktiivsete osakeste tase, mis mõjub negatiivselt sekundaarsetele sugutunnustele. Sellised tunnused peaksid seega signaalseerima isase head tervist ja võimet kahjutustada reaktiivseid osakesi ning vältida oksüdatiivset stressi (Monaghan *et al.* 2009).

1.3 Oksüdatiivse stressi roll vananemises

Vananemine on organismi füsioloogilise seisundi järkjärguline halvenemine, mis algab pärast suguküpsuse saavutamist (Nussey *et al.* 2013). On levinud arvamus, et looduslikes asurkondades sellise definitsiooni kohast vananemist ei toimu, kuna looduslik elukeskkond põhjustab loomade surma enne, kui vananemist põhjustavad geenid jõuavad nende elukäiku mõjutama hakata. Hiljutised uuringud on aga näidanud, et kui vananemist on pikaajaliste longitudinaalsete uuringutega looduslikest linnu- ja imetajapopulatsioonidest otsitud, on seda ka tavaliselt leitud (Nussey *et al.* 2013).

Vananemise seletamiseks on välja pakutud mitmeid teooriaid (ülevaade Selman *et al.* 2012, Nussey *et al.* 2013). Üks nendest, vabade radikaalide vananemisteooria, väidab, et vananemine toimub reaktiivsete osakeste paratamatu tootmise ja nende kahjuliku mõju kuhjumise tõttu (Harman 1956). Sellel teorial on märkimisväärne toetus. Samas on paljud teooriat testivad uuringud oma olemuselt korrelatiivsed ja hõlmavad vaid piiratud hulka mudelorganisme, seega ei tõesta need selgelt OS rolli vananemises (Costantini *et al.* 2010).

Vabade radikaalide vananemisteooria on arenenud edasi mitokondriaalseks vananemisteooriaks ja elukiiruse (*rate of living*) teooriaks, millest viimast käsitletakse tihti

sünonüümsena vabade radikaalide teooriaga (Costantini *et al.* 2010). Mitokondriaalne vananemisteooria väidab, et radikaalide poolt on eriti haavatav mitokondriaalne DNA, kuna vabad radikaalid tekivad organismis peamiselt mitokondriaalse energiatootmise kõrvalproduktina. Mitokondriaalse DNA lagunemise tõttu muutub oksüdatiivse fosforüleerimise protsess vähem efektiivseks, millest omakorda on tingitud veelgi suurem vabade radikaalide tootmine (Dowling ja Simmons 2009). Ka kromosoomi otstes paiknevad telomeerid on reaktiivsete osakeste poolt kergesti kahjustatavad. Oksüdatiivse stressi poolt põhjustatud telomeeride lühenemine kiirendab omakorda rakkude vananemist (Monaghan *et al.* 2009). Seega võib telomeeride kiirem lühenemine näidata, et organism koges kõrget oksüdatiivse stressi taset (Salomons *et al.* 2009).

Elukiiruse teooria (*rate of living theory*) kohaselt on kõrgema ainevahetuse baastasemega liikidel lühem eluiga. Selle põhjuseks on suurema energiatarbimisega kaasnev kõrgem mitokondriaalne aktiivsus, mille tulemusena toodetakse rohkem reaktiivseid osakesi (Dowling ja Simmons 2009). Reaktiivsete osakeste tootmine pole aga alati proportsionaalne mitokondriaalse aktiivsusega, kuna mitokondrid muutuvad suuremal tootlikkusel efektiivsemaks (Costantini *et al.* 2010). Siiski on mõistlik oletada, et väiksema hapnikutarbimisega loomaliigid toodavad vähem reaktiivseid osakesi kui suurema hapnikutarbimisega liigid. Pikaajalistel liikidel võib olla ka vähem kumulatiivseid OS kahjustusi ning neil võib olla ka teisi omadusi, mis neid oksüdatiivsetele kahjustustele vastupidavamaks teevad (Buttemer *et al.* 2010). Vastupidavust oksüdatiivsele stressile võib näiteks mõjutada rakumembraani fosfolipiidne koostis: mida rohkem on membraanis polüküllastumata rasvhappeid, seda vastuvõtlikum on see oksüdatiivsetele kahjustustele (Costantini *et al.* 2010).

Oksüdatiivse stressi mõju vananemisele on taksonite lõikes erinev ning seni ei ole seda paljude loomarühmade puhul uuritud. Keskendutud on peamiselt laboriloomadele, klassikalistele mudelorganismidele ning eelkõige lühiealistele liikidele. OS-i ja vananemise seoste mõistmiseks on aga vaja uurida erineva eluea, elukäigu ja taksonoomilise kuuluvusega liike.

1.4 Oksüdatiivse stressi seosed kohasusega: ülevaade uuringutest

Oksüdatiivse stressi mõju sigimisedukusele ja ellujäämusele looduses pole kuigi palju uuritud, samas näitavad laboratoorsed uuringud klassikaliste mudelliikide peal selgeid seoseid reaktiivsete osakeste, viljakuse ja suremuse vahel (ülevaade nt (Finkel ja Holbrook 2000)). Oksüdatiivne stress võib sigimisedukust mõjutada kahel viisil: mõjutades otseselt

reproduktiivsüsteemi (nt sugurakkude kvaliteeti või keskkonda, kus embrüo areneb) või halvendades vanemate seisundit ja selle kaudu nende võimet poegade eest hoolitseda (Bize *et al.* 2008). Oksüdatiivsete kahjustuste kuhjumine võib mõjutada aga eluiga (Beckman ja Ames 1998, Finkel ja Holbrook 2000).

Oksüdatiivse stressi uurimine looduslikes asurkondades annab kindlasti selgema pildi selle seostest kohasusega, kuna viimast saab adekvaatselt hinnata vaid tingimustes, milles asurkond on evolutsioneerunud (Salomons *et al.* 2009). Tabelis on toodud ülevaade vabalt elavatel lindudel tehtud uuringutest, milles individuaalsed erinevused OS-i parameetrites ennustavad erinevusi kohasuses. Selliseid uuringuid leiab suhteliselt vähe ja reeglina on mõõdetud vaid ühte OS-i parameetrit. Tabelisse ei ole kaasatud uuringuid, milles on näidatud, et suurem investeering mõnda kohasuse komponenti indutseerib oksüdatiivset stressi (vt nt Alonso-Alvarez *et al.* 2010, Beaulieu *et al.* 2011), kuna eesmärgiks ei ole uurida oksüdatiivse stressi tekkemehhanisme, vaid selle mõju linnu edaspidisele kohasusele. Oleks ehk liiga spekulatiivne oletada, et konkreetsete parameetrite väärtused määravad linnu kohasuse. Pigem võib eeldada, et leitud seosed näitavad, kui hästi peegeldab mõõdetud OS-i parameeter linnu üleüldist konditsiooni.

Tabel 1. Oksüdatiivse stressi parameetrite ja kohasuse komponentide vahelised seosed vabalt elavatel lindudel

Liik	OS parameeter	Kohasuse parameeter	Seos	Viide
Suitsupääsuke (<i>Hirundo rustica</i>)	Plasma antioksidantne mahtuvus (AOC)	Ellujäämus	Kõrge AOC tase ennustas ellujäämust	Saino <i>et al</i> 2011
Rasvatihane (<i>Parus major</i>)	Erütrotsüütide vastupanu vabade radikaalide rünnakule linnupoegadel	Lennuvõimestumine, ellujäämine järgmise sigimishooajani	Positiivne seos lennudevõimestumisega, seos ellujäämisega järgmise sigimishooajani puudus	Losdat <i>et al</i> 2013
Suitsupääsuke (<i>Hirundo rustica</i>)	Plasma karotenoidide kontsentratsioon	Lennuvõimestunud poegade arv	Suurem karotenoidide taseme langus sigimishooaja jooksul ennustas lennudevõimestunud poegade arvu	Safran <i>et al</i> 2010
Karikormoran (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Lipiidide peroksüdatsioon linnupoegadel	Suguküpsuse saavutamine	Suguküpsuseni jõudnud lindudel oli pojana madalam lipiidide peroksüdatsiooni tase	Noguer <i>a et al</i> 2011
Suurpiiritaja (<i>Apus melba</i>)	Erütrotsüütide vastupanu vabade radikaalide rünnakule	Kurna suurus, koorumisedukus, ellujäämus järgmise hooajani	Emastel positiivne seos kurna suuruse ja poegade koorumisedukusega, isastel ellujäämisega	Bize <i>et al</i> 2008
Kaelus-kärbsenäpp (<i>Ficedula albicollis</i>)	Plasma reaktiivsed hapniku metaboliidid (ROMs test) ja antioksidantne mahtuvus (OXY-test)	Kurna suurus, muna mass	Kurna suurusega seosed puudusid, muna massil positiivne seos antioksidantse mahtuvusega	Marko <i>et al</i> 2011

1.5 Oksüdatiivse stressi mõõtmine ja sellega seotud probleemid

Ökoloogidel on kalduvus kohelda organismi füsioloogiat kui "musta kasti" ning liigselt lihtsustada seda reguleeritud ja integreeritud süsteemi (Schmid-Hempel 2005). Seepärast on paljud ökoloogilised uurimused mõõtnud vaid ühte oksüdatiivse stressi komponenti (tavaliselt antioksidantide taset) eeldades, et see annab informatsiooni oksüdatiivse stressi kohta (Monaghan *et al.* 2009). Selline lähenemine on vale juba seetõttu, et antioksidantidel on lisaks oksüdatiivse tasakaalu säilitamisele organismis ka teisi funktsioone. Samuti on antioksidantide tase reguleeritav vastavalt vajadusele, seega ei pruugi antioksidantide hulk näidata otseselt oksüdantide taset organismis (Costantini *et al.* 2010). Kuna ükski kasutuses olev biomarker ei ole OS mõõtmiseks ideaalne, tuleks eelistatult kasutada nende kombinatsiooni (Hörak ja Cohen 2010). Isegi entusiastide seas puudub aga praegu üksmeel, millist biomarkerite kombinatsiooni kasutada (McGraw *et al.* 2010). Seepärast kannatavad paljud siiani avaldatud uurimused metodoloogiliste probleemide käes. Ei nõustuta isegi põhimõttelistes küsimustes, nagu kuidas defineerida oksüdatiivset stressi, oksüdatiivseid kahjustusi ja redokstasakaalu (Meitern *et al.* 2013).

Oksüdatiivse stressi mõõtmisel on vaja arvestada nelja komponendiga: vabade radikaalide tootmine, antioksidatiivne kaitse, oksüdatiivsed kahjustused ja raku parandusmehhanismid. Kahjustatud DNA, lipiidide ja valkude parandamine on vajalik raku funktsioonide ning nendest tulenevalt organismi kohasuse säilitamiseks. Siiski pole ökoloogid oma töödesse selliste mehhanismide mõõtmist alati kaasanud (Monaghan *et al.* 2009). Mitme OS komponendi mõõtmine on vajalik ka selleks, et kindlaks teha, kas vaadeldavad muutused nendes parameetrites on kontrollitud või kontrollimata. Kontrollitud muutused on organismi poolt füsioloogiliselt reguleeritud ja on tavaliselt organismile kasulikud. Kontrollimata protsessid toimuvad siis, kui regulatoorne süsteem ei funktsioneer piisava tõhususega. Sellised muutused on organismile tavaliselt kahjulikud (Hörak ja Cohen 2010).

Biokeemilised protsessid on osa süsteemist: iga parameetri tõlgendus sõltub sellest, mis toimub ülejäänud süsteemis (Hörak ja Cohen 2010). Selliste markerite tõlgendamine võib sõltuda samaaegselt teiste sarnaste markerite tasemest, isendi konditsioonist, isendi eelnevast elukäigust, keskkonnafaktoritest ja liigi füsioloogilistest ja biokeemilistest omapäradest (Hörak ja Cohen 2010). Seepärast tuleb lõpetada liiga lihtsate mudelite kasutamine OS-i kirjeldamisel. OS-i ja kohasuse vaheliste seoste uurimisel oleks ideaalne jälgida isendeid kogu nende eluea jooksul. Selliseid pikaajalisi uuringuid on lühiealiste loomaliikidega lihtne läbi viia. Pikealiste liikide puhul annavad OS-i ja kohasuse vahelistest seostest andmeid

läbilõikelised uuringud, millel on oma puudused (Hõrak ja Cohen 2010). Selliste uuringutega ei saa eristada isendisiseseid lõivsuhteid isenditevahelisest heterogeensusest. Näiteks pole võimalik eristada kõrgema kvaliteediga isendite vanusega kasvavaid oksüdatiivseid kahjustusi, kuna nende kahjustuste hulk pole märkimisväärselt suurem kui noorematel madalama kvaliteediga isenditel. OS-i ja kohasuse vahelisi lõivsuhteid võib mõjutada ka keskkond, milles isend oma eelneva elu on veetnud (Nussey *et al.* 2009). Kuna OS-i roll ja reguleerimine võib pika- ja lühiajalistel liikidel erineda (Buttemer *et al.* 2010, Hõrak ja Cohen 2010), on ka pikaajaliste liikide puhul vajalik läbi viia longitudinaalseid uuringuid.

1.6 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks oli erinevate füsioloogilise seisundi (sh redokstasakaalu) ja kohasuse parameetrite mõõtmine pikaajalisel linnuliigil, et tuvastada uuritud parameetrite seoseid vanuse ja suremusega. Kitsamateks eesmärkideks oli selgitada kas mõõdetud tunnuste hulgas on (1) vananemise ja (2) surmaeelse pesitsuskorraga seonduva tervise halvenemise kirjeldamiseks sobivaid markereid. Vananemine tähendab organismi funktsioonide järk-järgulist, progressiivset pöördumatut halvenemist vanuse kasvades. Kuna uuritavas kalakajakapopulatsioonis on registreeritud kõrge vanusega kaasnev kohasuse vähenemine (Rattiste 2004, Brommer *et al.* 2009), siis seati eesmärgiks kontrollida, kas samasugust kõrge vanusega kaasnevat muutust esineb ka erinevate biokeemiliste konditsiooniindeksite osas. Püstitatud hüpoteesi kohaselt seostuvad uuritud tunnused lindude vanusega kas lineaarselt või paraboolselt (eeldusel, et keskealised, ca 10. korda pesitsevad linnud on parimas füsioloogilises seisundis Rattiste 2004). Kuna uuritava populatsiooni kalakajakate sigimisedukus langeb hüppeliselt surmaeelsel pesitsusaastal (Rattiste 2004), siis püstitati täiendav hüpotees, mille kohaselt on surmaeelsel aastal pesitsejate füsioloogiline konditsioon teistsugune kui lindudel, keda mõõdeti pesitsusperioodil, mis ei jäänud nende jaoks viimaseks.

Lisaks huvitas mind uuritud parameetrite aastatevaheline individuaalne korduvus. Kuna erinevad kohasuse parameetrid peegeldavad organismi füsioloogia erinevaid aspekte, võivad mõned neist muutuda kiiresti, samal ajal kui teised peegeldavad indiviidi fenotüübi pikaajalisemat kohasust (Hõrak *et al.* 2002). Lühiajaliste ja pikaajaliste konditsiooninäitajate eristamine on seega olulise tähtsusega uurimaks isendite vahelist varieeruvust elukäigutunnustes ning nende seoseid fenotüübilise kohasusega (Hõrak *et al.* 2002).

2. Materjal ja meetodid

2.1 Uuritav populatsioon

Käesolevas magistritöös on kasutatud Matsalu Rahvusparkis asuval Kakrarahu laiul (58°46' N, 23°26' E) pesitsevast kajakakolooniast kogutud andmeid. Kalakajakad (*Larus canus*) on monogaamsed kolooniates pesitsevad pikaéalised merelinnud. Antud kolooniat on uuritud juba aastast 1962 (Brommer *et al.* 2009), seega on asurkonna demograafiline struktuur hästi teada. Magistritöös kasutatud andmed koguti kolmel järjestikusel aastal (2008, 2009, 2010).

Selle koloonia ja kahe naaberlaiu (Paljarahu ja Hoorahu) kolooniate uurimisel on leitud, et tavaliselt naaseb 50% isaslindudest ja 10% emaslindudest suguküpsuse saavutamisel sünnikolooniasse sigima (Rattiste 2004). Hõbekajaka (*Larus argentatus*) poolt põhjustatud konkurentsi tõttu, Matsalu rahvusparkis on noorlindude sünnikolooniasse naasmise protsent kasvavas trendis (Rattiste ja Tartes 2005). Sigivad linnud on väga paigatuud, vähem kui 3% lindudest vahetab kahe pesitsuse vahel kolooniat. Sellisel juhul liigutakse peamiselt naaberkolooniasse (Rattiste 2004). Seega on longitudinaalseteks uuringuteks lihtne koguda täpset indiidipõhist andmestikku. Kalakajaka kurna suurus ei varieeru ja kurnas on kolm muna. Pesitsusedukus sõltub munemise algusajast: paremas konditsioonis isendid alustavad munemist varem. Umbes kümnest protsendist munadest koorunud pojad elavad suguküpsuseni. Enamasti alustavad kalakajakad pesitsemist 3.-4. eluaastal ning pesitsevad keskmiselt 5-6 aastat. Pärast kümnendat pesitsusaastat hakkab nende sigimisedukus kahanema. Täiskasvanud lindude aastane ellujäämus on 86-93%, 20% lindudest jätkab pesitsemist ka pärast kümnendat eluaastat (Rattiste 2004). Vanim lind uuritavas koloonias on 33-aastane emaslind (sündinud 1981. aastal Kakrarahul), kes on teadaolevalt ka Eesti vanim kalakajakas (Kalev Rattiste suulised andmed).

2.2 Mõõdetud parameetrid

2.2.1 Kohasuse parameetrid

Sigivad linnud püüti pesalt esimesel pesitsusaastal, määrati nende sugu ning märgistati individuaalset äratundmist võimaldava plastikrõngaga. Kui lind ei olnud märgistatud juba pesapojana, lisati ka Estonia Matsalu signatuuriga metallrõngas. Soo määramiseks mõõdeti kajaka pea pikkus (isaslinnud on suuremad kui emaslinnud) ning vajadusel kontrolliti

määrangut lindude sigimiskäitumise järgi. Järgnevatel pesitsusaastatel identifitseeriti linde ilma neid kinni püüdmata, plastikrõnga järgi.

Kuna paljude uuringus kasutatud lindude (eelkõige emaslindude) sünniaasta ei olnud teada, kasutati analüüsil linnu vanuse iseloomustamiseks tunnust „sigimisaasta“, mis näitab, mitmendat aastat antud lind pesitseb. Tunnus „viimane sigimisaasta“ näitab, et pärast antud aastat pole lindu enam kohatud ning ta on tõenäoliselt surnud.

Munemisaja algus on igapäevastel ringkäikudel koloonias kindlaks tehtud esimese muna munemise aeg ning on väljendatud aprillikuu päevades (1. aprill = päev 1, 1. mai = päev 31). Kõik munad kurnas märgistati vastavalt nende munemise järjekorrale ja kaaluti. Kurna hävimisel (uppumine, rüüstamine) märgiti uus kurn kas jätkukurnaks (emaslind jätkas munemist uude pessa) või järelkurnaks (hauduma asunud emaslinnul kulus munemistsükli taaskäivitamiseks 8-10 päeva).

2.2.2 Biokeemilised analüüsid

Vereproovid võeti 2008., 2009. ja 2010. aasta kevadel. Plasma ja vererakud eraldati proovi võtmise päeval tsentrifuugimise teel. Proovid säilitati kuni analüüsimiseni -80°C juures. Vältimaks pesade hülgamist, ei alustatud vanalindude püüki pesadelt enne 10 päeva möödumist viimase muna munemisest (sel ajal püütud linnud ei jäta pesa maha). Pesitsusstaadiumi iseloomustati esimese muna munemisest kulunud aja järgi (tunnus: „pesitsusstaadium“). Arvestamiseks biokeemiliste markerite ööpäevast varieeruvust, märgiti üles ka linnu püüdmise kellaeg. Enne vereproovi võtmist linnud kaaluti.

Antioksidantidest määrati karotenoidide glutatiooni ja kusihippe tase. Karotenoidid on rasvlahustuvad süsivesinikud, mida loomad *de novo* sünteesida ei suuda, ning peavad seega toiduga omandama. Oma keemilise struktuuri tõttu neelavad karotenoidid sini-rohelist valgusspektrit (400-500 nm) ning näivad seega inimsilmale kollaste ja punastena. Samuti on neil *in vitro* antioksidatiivsed omadused (Svensson ja Wong 2011). Karotenoidne pigmentatsioon on seega seotud fundamentaalsete redoksradadega, kuid karotenoidsetel pigmentidel põhinevate suguliste signaalide ausust tagavate füsioloogiliste mehhanismide osas pole tänapäeval veel üksmeelele jõutud (Hill ja Johnson 2012). Karotenoidide kontsentratsioon määrati 2008., 2009. ja 2010. aasta proovidest. Kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt atsetoonis lahjendatud 15 µl plasmast (metoodika kirjeldus: Tummeleht *et al.* 2006). Karotenoidide kontsentratsiooni väljendati µg/ml.

Glutatioon on tripeptiidne tiol, mida esineb peaaegu kõigis loomarakkudes. Glutatiooni funktsioonid rakus on valkude disulfiidsildade redutseerimine, DNA deoksüribonukleotiidi

prekursorite sünteesimine ja raku kaitsmine vabade radikaalide eest. Glutatiooni loetakse seepärast tihti kõige tähtsamaks rakusiseseks antioksidandiks (Galvan ja Alonso-Alvarez 2008). Erütrotsüütide glutatiooni (GSH) tase määrati 2009. ja 2010. aasta proovidest (metoodika kirjeldus: Rahman *et al.* 2006, Galvan ja Alonso-Alvarez 2008). Tulemused on antud μmol grammi veretombu kohta (veretomp on vere tsentrifuugimisel tekkiv tahke jääk, mis koosneb peamiselt erütrotsüütidest).

Kusihape on lindude peamine lämmastikumetabolismi saadus, mis tekib nii toiduga saadud- kui kehaomaste valkude lagundamisel (Wright 1995). Lindudel on võrreldes teiste selgroogsetega kusihappe ja selle soolade kontsentratsioon eriti kõrge (Tsahar *et al.* 2006). Kuna lindudel puudub uraadi oksüdaas, mis kusihappe allantoiiniks oksüdeeriks, peab see protsess toimuma mitteensümaatilisel teiste oksüdantide, nagu reaktiivsed osakesed, toimel (Tsahar *et al.* 2006). Kusihappe antioksidatiivsete omaduste ja selle rohkuse tõttu arvatakse, et see on üks peamisi aineid, mis linde oksüdatiivse stressi eest kaitseb (Tsahar *et al.* 2006). Kusihappe kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt 5 μl plasmast, standardkomplekti abil (Human GmbH kit, Weisbaden, Germany). Kusihappe kontsentratsioon on arvatud mg/dl.

Lisaks individuaalsetele antioksidantidele määrati ka plasma antioksidantne kogumahtuvus (*total antioxidant capacity*, TAC). TAC peegeldab koeproovis olevate erinevate veeslahustuvate antioksidantide koguhulka. Peamised TAC-i komponendid on plasma kusihape ja valkude vabad sulfhüdrüülrühmad (Erel 2004, Sepp *et al.* 2010). TAC mõõdeti kõigil kolmel aastal 5 μl plasmast (metoodika kirjeldus: Erel 2004, Sepp *et al.* 2010). See meetod põhineb plasma antioksidantide võimel värvitustada 2,2-asinobis(3-etüülbensotiasoliin-6-sulfonaati) (ABTS+). Tulemused on antud $\mu\text{mol/l}$ troloksi (vesilahustuv vitamiin-E analoog) ekvivalendi järgi. Kuna suure osa TAC-i väärtusest annab kusihape, (Costantini 2011), arvutati ka TAC-i jäägid regressioonist kusihappega.

Lisaks kirjeldati lindude oksüdatiivset seisundit plasma oksüdatiivse staatuse (*total oxidant status*, TOS) abil. TOS näitab erinevate reaktiivsete osakeste koguhulka koeproovis (Erel 2005). TOS mõõdeti 2009. ja 2010. aastal, kuid kuna 2009 aasta andmed olid suures osas alla meetodi detekteerimispiiri, kasutati ainult 2010 aasta andmeid. Mõõtmisel kasutati meetodit, mida on kirjeldanud Erel (2005) ja mis põhineb Fe^{2+} oksüdeerimisel Fe^{3+} iooniks. Tulemused on arvatud $\mu\text{mol/l}$ vesinikperoksiidi (H_2O_2) ekvivalendi järgi.

Oksüdatiivse stressi markerina mõõdeti homotsüsteiini taset. Homotsüsteiin (HCY) on tiolrühma sisaldav aminohape, mis tekib metioniini rakusisesel demetüleerimisel. Homotsüsteiini reaktiivne tiolrühm võib hapniku juuresolekul oksüdeeruda disulfiidsillaks.

Selle reaktsiooni kõrvalproduktina võib tekkida palju reaktiivseid hapnikuosakesi, nagu superoksiidi anioon ja vesinikperoksiid (Jacobsen 2000). Homotsüsteiini taset mõõdeti vaid 2009. aastal, kasutades selleks standardkomplekti (Axis Homocysteine EIA, Axis-Shield Diagnostics Ltd.). Tulemused on arvatud $\mu\text{mol/l}$.

Oksüdatiivse stressi markeritest mõõdeti ka lipiidide peroksüdatsiooni (LPO), mis on hästituntud loomade rakuvigastuste mehhanism ning mida kasutatakse seepärast ka oksüdatiivse stressi indikaatorina (Niki 2009). Antud markerit mõõdeti vaid 2009. aastal. Lipiidide peroksüdatsiooni mõõtmiseks kasutati standardkomplekti (Bioxytech LPO-586, Oxisresearch), mis põhineb maloondialdehüüdi (MDA) ja 4-hüdroksüalkenaalide (HAE) koguste spektrofotomeetrilisel määramisel. MDA ja HAE on küllastumata rasvhapete peroksüdatsiooni saadused ning neid on ennegi lipiidide peroksüdatsiooni mõõtmiseks kasutatud (Esterbauer *et al.* 1991). Tulemused on arvatud $\mu\text{mol/l}$.

Lisaks oksüdatiivse staatuse parameetritele mõõdeti ka kaht biokeemilist konditsiooninäitajat, plasma valkude üldkontsentratsiooni ja triglütseriidide, mis peaksid eelkõige peegeldama lindude toitumust ja tervislikku seisundit. Neid näitajaid mõõdeti kõigil kolmel aastal. Seerumi koguvalk mõõdeti spektrofotomeetriliselt 5 μl plasmast, standardkomplekti abil (Human GmbH kit, Weisbaden, Germany). Plasma koguvalk mõõdeti g/l. Triglütseriidide tase mõõdeti 2,5 μl plasmast standardkomplekti abil (Human GmbH kit, Weisbaden, Germany). Tulemused arvutati mmol/l.

2.3 Statistilised meetodid

Andmeanalüüsiks kasutati üldistatud segamudeleid, milles isendi identiteet määrati juhuslikuks faktoriks ning sõltuvaks tunnuseks uuritav füsioloogiline või sigimisparameeter. Kirjeldamaks mõõdetud parameetrite seoseid lindude vanusega (mille lähendusena kasutati sigimisaastat) sisestati sigimisaasta mudelisse pideva tunnusena. Kõiki mudeleid testiti ka sigimisaasta ruutliikme olulisuse suhtes, tuvastamaks võimalike paraboolseid seoseid vanusega. Kõigi mudelites testiti potentsiaalsete mürafaktorite (uurimisaasta (faktor) ja pesitsusstaadium (pidev tunnus) ning nende interaktsioon) olulisust. Linnu massi uurivates mudelites võeti mürafaktorina arvesse ka pea pikkus (pea^3). Mitteolulised mürafaktorid kõrvaldati lõppmudelist. Kui linnu sugu mõjutas uuritavat tunnust oluliselt, siis analüüsiti emaste ja isaste andmeid eraldi, et vältida keeruliste interaktsioonidega raskestitõlgendatavaid mudeleid. Kurna massi uurivatest mudelitest eemaldati jätku- ja järelkurnad, kuna oli põhjust arvata, et need on oluliselt kergemad. Et testida, kas lindude füsioloogilised või sigimisparameetrid on viimasel pesitsuskorral teistsugused kui ülejäänud pesitsuskordadel,

kasutati sigimisaasta (ja selle ruutliikme) asemel mudelis tunnust „viimane sigimisaasta“ (kahe tasemega faktor). Mõõtmaks uuritud parameetrite aastatevahelisi individuaalseid korduvusi kasutati mudeleid, kus sõltuvaks tunnuseks oli uuritav füsioloogiline või sigimisparameeter ning olulisuse korral kaasati mürafaktoritena uurimisaasta ja/või pesitsusstaadium. Tunnuse korduvus arvutati isendi identiteedi arvele langeva varieeruvuse suhtena üldvarieeruvusse (Nakagawa ja Schielzeth 2010). Analüüsiks kasutati programmi SAS versioon 9.2, Glimmix protseduuri. Kõigi mudelite jääkide vastavust normaaljaotusele kontrolliti visuaalselt; lahknevuse korral kümnendlogaritmiti tunnuste väärtused. Aktsepteeritavaks usaldusnivooks oli 0.05.

3. Tulemused

Peaaegu ükski mõõdetud oksüdatiivse seisundi parameetritest lindude vanusega ega vanuse ruutliikmega seotud ei olnud (tabel 2). Vaid emaste triglütseriidide tasemel oli lineaarne seos vanusega (joonis 2). Vanuse mõju uurivates mudelites varieerusid aastate lõikes karotenoidide, kusihappe, glutatiooni, valkude ja triglütseriidide (ainult isastel) kontsentratsioon, samuti TAC ja selle jäägid. Lisaks erinesid aastate lõikes lindude mass, kurna mass ning sigimisaja algus. Parameetrite väärtust mõjutas ka see, millises pesitsustaadiumis linnult vereproov võeti. Pesitsustaadium mõjutas karotenoidide ja kusihappe taset, TAC-i, TAC-i jääke, homotsüsteiini kontsentratsiooni, valkude taset (emastel) ning triglütseriidide taset. Aasta ja pesitsustaadiumi koosmõju avaldus karotenoidide, TAC-i, TAC-i jääkide ning emastel lindudel ka valkude ja triglütseriidide kontsentratsiooni juures. Emastel lindudel mõjutasid kurna massi ja sigimisaja algust vanus ning vanuse ruutliige. Munemisaja algus oli samuti linnu vanusest ja selle ruutliikmest mõjutatud. Munemisaja alguse ja kurna massi sõltuvus vanusest on esitatud joonisel 1.

Seoseid suremusega uuriti lindudel, keda pärast nende viimast sigimisaastat enam koloonias kohatud polnud. Selliseid linde oli valimis 52. Peaaegu ükski mõõdetud oksüdatiivse staatuse parameetritest suremist ette ei ennustanud (tabel 3). Ainult emaste lindude plasma oksüdatiivse staatuse (*total oxidative status*, TOS) ja suremust vahel esines statistiliselt oluline seos (joonis 3). Samuti ei ennustanud suremust linnu mass ning emaste sigimisaja algus ning kurna mass. Ka suremuse seoseid uurivates mudelites avaldusid erinevate aastate ning pesitsustaadiumi mõju mõõdetud vereparameetritele.

Mõõdetud oksüdatiivse seisundi parameetritest esines aastatevaheline individuaalne korduvus karotenoidide ja kusihappe puhul. Biokeemilistest konditsiooninäitajatest kordus individuaalselt ajas plasma koguvalgu kontsentratsioon. Lisaks olid individuaalselt ajas püsivad mass, sigimisaja algus ning kurna mass (tabel 4).

Tabel 2 Sigimis- ja füsioloogiliste parameetrite sõltuvus vanusest (sigimisaasta)

	Isendite arv	Vaatluste arv	Df	Den. Df	F	p
Karot* µg/ml	90	214	Sugu:E			
Aasta			2	177,2	3,72	0,026
Stadium			1	196,7	25,01	<0,0001
Aasta*Stadium			2	177,2	5,99	0,003
Sigimisaasta			1	114,3	2,07	0,153
Sigimisaasta ²			1	115	1,91	0,170
Karot* µg/ml	98	232	Sugu:I			
Aasta			2	183,6	3,80	0,024
Stadium			1	207,3	21,10	<0,0001
Aasta*Stadium			2	185,1	6,09	0,003
Sigimisaasta			1	130,1	0,43	0,514
Sigimisaasta ²			1	129,9	0,48	0,488
TAC* µmol/l	185	444				
Aasta			2	412,9	45,57	<0,0001
Stage			1	420,3	12,25	0,0005
Aasta*Stage			2	415,4	24,60	<0,0001
Sigimisaasta			1	218,1	0,01	0,939
Sigimisaasta ²			1	219,1	0,10	0,7573
TAC(URIC)*µM	184	437				
Aasta			2	428	61,40	<0,0001
Aasta*Stadium			2	428	31,82	<0,0001
Kusihape			1	428	177,89	<0,0001
Stadium			1	428	35,83	<0,0001
Sigimisaasta			1	428	0,00	0,977
Sigimisaasta ²			1	428	0,11	0,745
TOS µmol/l	68	68	Sugu:E			
Sigimisaasta			1	65	2,32	0,132
Sigimisaasta ²			1	65	0,66	0,418
TOS µmol/l	78	78	Sugu:I			
Sigimisaasta			1	75	1,01	0,319
Sigimisaasta ²			1	75	0,96	0,329
GSH µmol/g	137	178				
Aasta			1	70,38	60,41	<0,0001
Sigimisaasta			1	107,6	1,10	0,297
Sigimisaasta ²			1	104,9	0,96	0,330
HCY µmol/l	45	45				
Stadium			1	41	6,08	0,018
Sigimisaasta			1	41	0,01	0,918
Sigimisaasta ²			1	41	0,03	0,865

	Isendite arv	Vaatluste arv	Df	Den. Df	F	p
LPO $\mu\text{mol/l}$	94	94				
Sigimisaasta			1	91	3,21	0,077
Sigimisaasta ²			1	91	1,62	0,206
VALK g/l	93	244	Sugu:E			
Aasta			2	187,9	17,01	<0,0001
Stadium			1	222,2	11,94	0,001
Aasta*Stadium			2	189,3	16,09	<0,0001
Sigimisaasta			1	130	0,85	0,358
Sigimisaasta ²			1	132,3	0,29	0,594
VALK g/l	98	267	Sugu:I			
Aasta			2	181,1	10,31	<0,0001
Sigimisaasta			1	127,9	0,07	0,792
Sigimisaasta ²			1	129,3	0,02	0,884
TRIGL* mmol/l	93	239	Sugu:E			
Aasta			2	215,6	2,58	0,0778
Stadium			1	230,1	11,31	0,001
Aasta*Stadium			2	216,8	3,11	0,047
Sigimisaasta			1	114,5	5,51	0,021
Sigimisaasta ²			1	114,7	2,88	0,092
TRIGL* mmol/l	98	258	Sugu:I			
Aasta			2	178,9	7,82	0,0006
Stadium			1	237,1	17,37	<0,0001
Sigimisaasta			1	110	0,36	0,549
Sigimisaasta ²			1	108,7	1,56	0,215
URIC mg/dl	191	509				
Stadium			1	502,1	9,33	0,001
Sigimisaasta			1	244,8	0,06	0,814
Sigimisaasta ²			1	240,5	0,08	0,781
Mass g	93	247	Sugu:E			
Aasta			2	174,1	15,50	<0,0001
Pea ³			1	91,32	19,39	<0,0001
Sigimisaasta			1	167,8	0,02	0,877
Sigimisaasta ²			1	177,2	0,16	0,691
Mass g	98	265	Sugu:I			
Aasta			2	187,3	21,05	<0,0001
Pea ³			1	92,05	17,86	<0,0001
Sigimisaasta			1	203,1	1,05	0,361
Sigimisaasta ²			1	214,3	0,23	0,634
Kurna mass g	91	194	Sugu:E			
Aasta			2	122,7	13,08	<0,0001
Sigimisaasta			1	171,9	18,09	<0,0001
Sigimisaasta ²			1	179	16,82	<0,0001

	Isendite arv	Vaatluste arv	Df	Den. Df	F	p
Start A.p.	93	221	Sugu:E			
Aasta			2	145,5	97,65	<0,0001
Sigimisaasta			1	122,3	35,56	<0,0001
Sigimisaasta ²			1	126,1	30,75	<0,0001

* antud tunnus on normaaljaotuse saavutamiseks kümnendlogaritmitud

Karot – karotenoidid

TAC – plasma antioksidantne kogumahtuvus

TAC(URIC) – TAC jäägid kusihapest

TOS – plasma oksüdatiivne staatus

GSH – glutatioon

HCY – homotsüsteiin

LPO – lipiidide peroksüdatsioon

VALK – plasma valkude üldkontsentratsioon

TRIGL – triglütseriidid

URIC – kusiha

Start – munemisaja algus (A.p. – aprillikuu päevades)

Tabel 3 Sigimis- ja füsioloogiliste parameetrite sõltuvus viimasest sigimisaastast

	Isendite arv	Vaatluste arv	Num. D.f.	Den. Df.	F	p
Karot* µg/ml	90	214	Sugu:E			
Aasta			2	180,4	3,25	0,041
Stadium			1	204,5	22,12	<0,0001
Aasta*Stadium			2	179,6	5,29	0,006
Viimane aasta			1	206,9	0,34	0,560
Karot* µg/ml	98	232	Sugu:I			
Aasta			2	184	3,69	0,027
Stadium			1	213,7	21,02	<0,0001
Aasta*Stadium			2	185	5,94	0,003
Viimane aasta			1	224,9	0,03	0,868
TAC* µmol/l	185	444				
Aasta			2	412,7	45,37	<0,0001
Stadium			1	414,9	14,15	0,0002
Aasta*Stadium			2	415,1	24,59	<0,0001
Viimane aasta			1	437	0,46	0,497
TAC(URIC)*µM	184	437				
Aasta			2	429	60,93	<0,0001
Kusiha			1	429	177,60	<0,0001
Stadium			1	429	41,62	<0,0001
Aasta*Stadium			2	429	31,77	<0,0001
Viimane aasta			1	429	0,84	0,359

	Isendite arv	Vaatluste arv	Num. D.f.	Den. Df.	F	p
TOS $\mu\text{mol/l}$	68	68	Sugu:E			
Viimane aasta			1	66	4,28	0,042
TOS $\mu\text{mol/l}$	78	78	Sugu:I			
Viimane aasta			1	76	0,08	0,777
GSH $\mu\text{mol/g}$	137	178				
Aasta			1	126	10,03	0,002
Staadium			1	160,6	6,31	0,013
Aasta*Staadium			1	136,9	4,03	0,047
Viimane aasta			1	172,2	0,51	0,478
HCY $\mu\text{mol/l}$	45	45				
Staadium			1	42	7,03	0,011
Viimane aasta			1	42	0,08	0,783
LPO $\mu\text{mol/l}$	94	94				
Staadium			1	91	6,22	0,014
Viimane aasta			1	91	0,03	0,863
VALK g/l	93	244	Sugu:E			
Aasta			2	188,1	16,97	<0,0001
Staadium			1	229,6	15,11	0,0001
Aasta*Staadium			2	188,8	15,94	<0,0001
Viimane aasta			1	236,9	0,39	0,532
VALK g/l	98	267	Sugu:I			
Aasta			2	176	10,53	<0,0001
Viimane aasta			1	262,8	0,03	0,871
TRIGL* mmol/l	93	239	Sugu:E			
Aasta			2	212,8	3,03	0,05
Staadium			1	230	18,66	<0,0001
Aasta*Staadium			2	213,8	3,84	0,023
Viimane aasta			1	232	1,64	0,202
TRIGL* mmol/l	98	258	Sugu:I			
Aasta			2	173	8,51	0,0003
Staadium			1	238,4	19,77	<0,0001
Viimane aasta			1	252,9	0,04	0,840
URIC mg/dl	191	509				
Staadium			1	493,2	11,12	0,001
Viimane aasta			1	505,9	0,73	0,395
Mass g	93	247	Sugu:E			
Aasta			2	163,5	14,4	<0,0001
Pea ³			1	91,69	20,52	<0,0001
Viimane aasta			1	231,8	0,37	0,543
Mass g	98	265	Sugu:I			
Aasta			2	171,1	20,91	<0,0001
Pea ³			1	93,48	19,79	<0,0001
Viimane aasta			1	241,1	0,79	0,374

	Isendite arv	Vaatluste arv	Num. D.f.	Den. Df.	F	p
Start A.p.	93	221	Sugu:E			
Aasta			2	132,5	77,84	<0,0001
Viimane aasta			1	216,8	0,92	0,339
Kurna mass g	91	194	Sugu:E			
Aasta			2	106,5	3,07	0,0001
Viimane aasta			1	160,5	0,14	0,708

* antud tunnus on normaaljaotuse saavutamiseks kümnendlogaritmitud

Karot – karotenoidid

TAC – plasma antioksidantne kogumahtuvus

TAC(URIC) – TAC jäägid kusihapest

TOS – plasma oksüdatiivne staatus

GSH – glutatioon

HCY – homotsüsteiin

LPO – lipiidide peroksüdatsioon

VALK – plasma valkude üldkontsentratsioon

TRIGL – triglütseriidid

URIC – kusihaape

Start – munemisaja algus (A.p. – aprillikuu päevades)

Viimane aasta – viimane sigimisaasta

Tabel 4 Kohasuse parameetrite korduvused

Tunnus	Isendite arv	Vaatluste arv	Korduvus	p
karot emased*	90	214	0,3	<0,0001
karot isased*	98	232	0,32	<0,0001
TAC (URIC)*	184	437	0	1
TAC*	185	444	0,04	0,236
GSH	137	178	0,25	0,13
VALK emased	93	244	0,35	<0,0001
VALK isased	98	267	0,33	<0,0001
TRIGL emased*	93	237	0,09	0,138
TRIGL isased*	98	258	0,05	0,234
URIC	191	509	0,12	0,005
Mass emased	93	247	0,7	<0,0001
Mass isased	98	265	0,74	<0,0001
Munemise algus**	93	218	0,49	<0,0001
Kurna mass**	91	191	0,86	<0,0001

* antud tunnus on normaaljaotuse saavutamiseks kümnendlogaritmitud

** nimetatud tunnust arvestati ainult emastel

Karot – karotenoidid

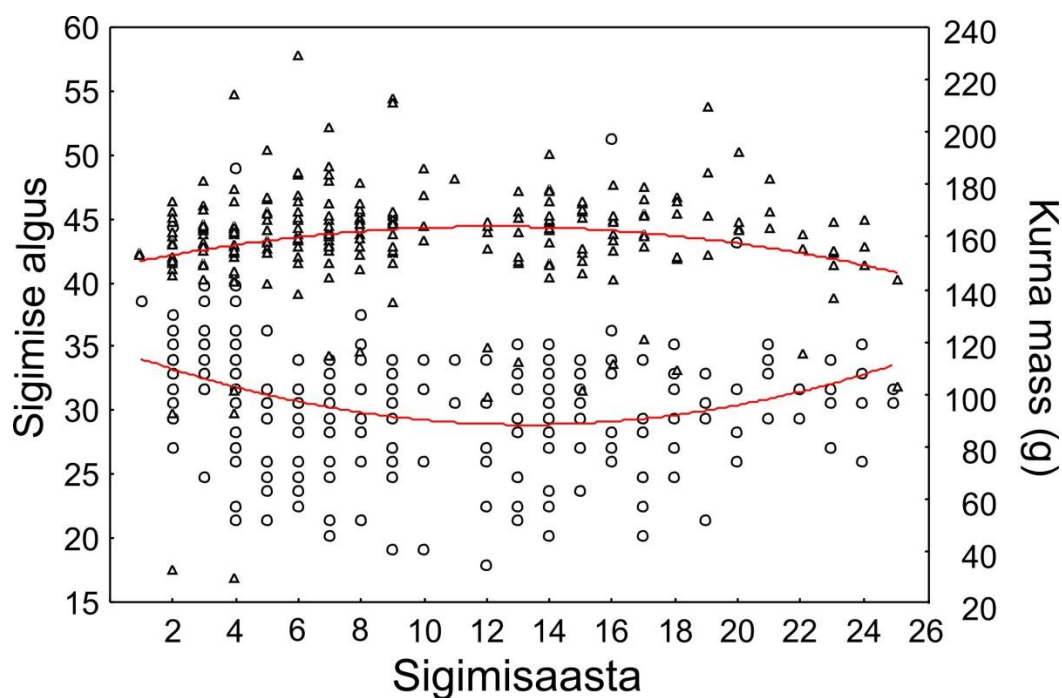
TAC(URIC) – TAC jäägid kusihaigest

GSH – glutatioon

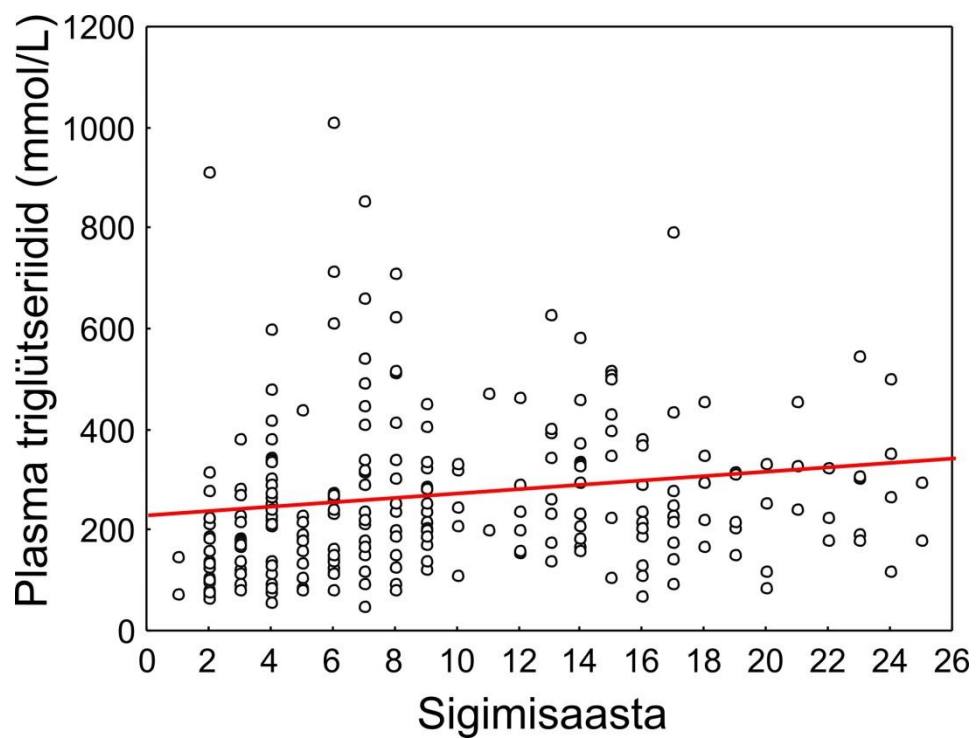
VALK – plasma valkude üldkontsentratsioon

TRIGL – triglütseriidid

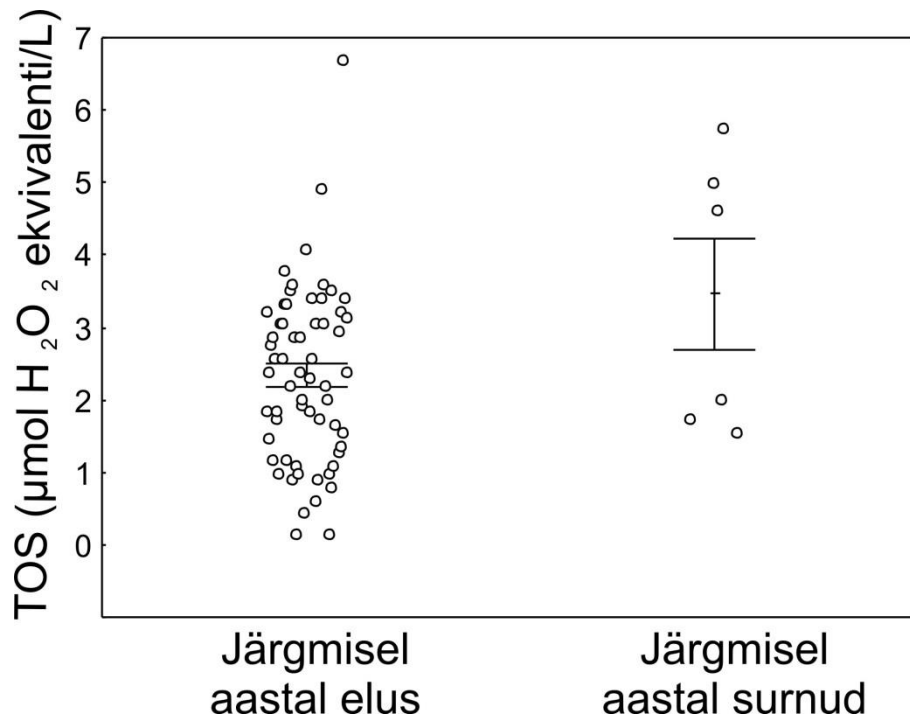
URIC – kusihape



Joonis 1. Sigimisaja alguse ja kurna massi sõltuvus linu vanusest (sigimisaasta). Kolmnurgad tähistavad kurna massi ja ringid tähistavad munemisaja algust



Joonis 2. Emaste lindude plasma triglütseriidide kontsentratsiooni sõltuvus vanusest (sigimisaasta)



Joonis 3. Emaste lindude plasma oksüdatiivse staatuse sõltuvus viimasest sigimisaastast (järgmisel aastal elus vs järgmisel aastal surnud). Näidatud on keskmine ja standardvead. N=68

4. Arutelu

Seosed vanuse ja sigimisedukuse parameetrite vahel näitavad, et vananemine antud valimis esines. Sama asurkonna uurimisel on leitud, et sigimisedukus üldjuhul suureneb kogemuste kasvamise arvelt kuni 10. pesitsusaastani ning hakkab seejärel vähenema, tehes eriti järsu languse surmaeelsel pesitsusaastal (Rattiste 2004). Käesolevas uuringus aga seoseid surmaeelse pesitsusaasta ning sigimisedukuse parameetrite vahel ei leitud. Käesolev uurimus põhineb vaid kolme aasta andmetel, samas, kui Rattiste (2004) uurimuse andmestik oli kogutud pikema aja vältel (1968-1983 ja 1986-2004), seega on võimalik, et sellised mustrid ei jõua kolme aasta jooksul avalduda. Kuna antud asurkonna isendite ellujäämus on peamiselt mõjutatud talve karmusest (Rattiste ja Lilleleht 1995), on võimalik, et nende aastate talved olid kas erakordselt pehmed, mille tõttu halvasti siginud isendid ei hukkunud, või erakordselt külmad, mille tõttu hukkusid ka paremas konditsioonis isendid. Samas, kuna lindude surmapõhjused ei olnud üldjuhul teada, võib seose puudumine näidata ka seda, et paljude antud valimi lindude surma võisid põhjustada juhuslikud sündmused (nt. rookulli saagiks langemine, mis K.Rattiste suulistel andmetel sõltub rohkem pesa asupaigast kui linnu konditsioonist).

Kuna mitmeid oksüdatiivse seisundi parameetreid mõõdeti samadel lindudel mitmel aastal, oli võimalik hinnata parameetrite püsivust ajas. Läbi aastate olid individuaalselt korduvad kusihaape tase ja karotenoidide tase. Mulle teadaolevalt ei ole looduslikes linnuasurkondades varem karotenoidide kontsentratsioonil vereplasmas aastatevahelist korduvust uuritud. Samas on Sepp ja teised (2012) leidnud, et laboritingimustes peetud rohevintidel (*Carduelis chloris*) esines kaheksa päeva jooksul vereplasma karotenoididel märgatav individuaalne korduvus, mis suurema valimi korral oleks tõenäoliselt oluline tulnud ka 16 päevase ajavahemiku raames. Karotenoidid on rasvlahustuvad süsivesinikud, mida loomad *de novo* sünteesida ei suuda, ning peavad seega toiduga omandama (Svensson ja Wong 2011). Kuigi karotenoidne värvus on seotud fundamentaalsete redoksradadega, ei ole selle seose mehhanismides üksmeelele jõutud. Selge on aga see, et isegi liigisiselt esineb asurkondade, sugude, indiviidide ja isegi sama indiviidi koetüüpide vahel erinevusi karotenoidide omastamisel, kasutamisel ja karotenoididel signaliseerimisel (Svensson ja Wong 2011). Ka käesolevast uuringust tuli välja et vereplasma karotenoidide sisaldus oli linnu soost sõltuv. Üks võimalus on karotenoidide individuaalset aastatevahelist korduvust seletada erinevate toidueelistustega, kuid tuleb arvesse võtta, et ka karotenoidide omastamine toidust võib olla individuaalselt varieeruv. Sõltumata korduvuse füsioloogilisest põhjusest viitab

käesolev uurimus, et karotenoidide kontsentratsioon kalakajaka vereplasmas võib adekvaatselt peegeldada linnu pikaajalist tervislikku seisundit ning karotenoidselt värvunud kehaosad võivad sellest lähtuvalt kalakajakal ausalt signaliseerida linnu kvaliteeti. Karotenoidsete kehaosade värvuse intensiivsuse ja linnu oksüdatiivse seisundi seoste uurimine kalakajakal võib seega olla üks võimalikest käesoleva töö edasiarendustest.

Kusihape on lindude peamine lämmastikumetabolismi saadus, mis on lindudel ka tähtsaks antioksidandiks (Tsahar *et al.* 2006). Kuigi kusihappe hulk veres sõltub söögist möödunud ajast (Voss ja Siems 2006), leidis ka hiljutine tehistingimustes peetud sebra-amadiinidel (*Taeniopygia guttata*) teostatud uuring, milles mõõdeti mitmeid OS parameetreid samadel isenditel neljakuulise vahega, et selle väärtuses esines statistiliselt oluline korduvus (Romero-Haro ja Alonso-Alvarez 2014). Kuna kusihape on lindude lämmastikumetabolismi saadus, on võimalik, et individuaalsed erinevused kusihappe kontsentratsioonis tulenevad lindude erinevatest toidueelistustest. Seda hüpoteesi toetab asjaolu, et ka toiduga omastatavate karotenoidide kontsentratsioon veres oli individuaalselt korduv. Samas on metskalkuni (*Meleagris gallopavo*) erinevatel kodustatud liinidel läbiviidud uuring leidnud, et vereplasma kusihappe baastase on ka geneetiliselt määratud (Hartman *et al.* 2006). Mõistmaks, kas individuaalne korduvus karotenoidide ja kusihappe kontsentratsioonides on geneetiliselt määratud, või sõltub toidueelistusest, tuleks tulevikus uurida kalakajaka toitumiseelistusi.

TAC peegeldab organismis ringluses olevate erinevate vesilahustuvate antioksidantide koguhulka. TAC ja TAC-i jäägid ei olnud ajas korduvad. See on vastuolus suitsupääsukesel läbiviidud uurimuse tulemustega, mis näitasid, et plasma antioksidatiivne mahutavus (AOC) oli nii pesitsusperioodi vältel kui aastate vahel isendisiseselt korduv (Saino *et al.* 2011). Ka tehistingimustes peetud sebra-amadiinidel läbi viidud katse näitas, et TAC on individuaalselt korduv (Romero-Haro ja Alonso-Alvarez 2014). TAC-i peamisteks komponentideks on kusihape ja valkude vabad sulfhüdrüülrühmad (Erel 2004, Sepp *et al.* 2010). Kuna kusihappe kontsentratsioon plasmas on käesoleva uurimuse andmetel kalakajakal individuaalselt korduv, võib oletada, et vaatamata selle suurele korreleeruvusele TAC-iga moodustab see veres ringlevatest antioksidantidest väiksema osa kui valkude vabad sulfhüdrüülrühmad. Käesoleva uurimuse põhjal võib järeldada, et TAC peegeldab kalakajakal pigem linnu hetkeseisundit kui pikemaajalisi (genotüübist tulenevaid) isenditevahelisi erinevusi. Tõenäoliselt on selle parameetri väärtus seega keskkonnatingimuste poolt rohkem mõjutatud kui kusihappe või karotenoidide taseme väärtused.

Mõõdetud parameetritest vaid kaks olid seotud vanuse või suremusega: emaste lindude TOS oli sõltuv vanusest ning triglütseriidide tase sõltus lineaarselt pesitsusaastast. Kuna

analüüsil kasutati vaid ühe aasta TOS-i andmeid, ei saanud antud parameetri aastatevahelist korduvust mõõta, seega ei ole kindel, kui adekvaatselt see kalakajaka puhul linu pikaajalist konditsiooni peegeldab. Triglutseriidide tase veres ei olnud ei isaste ega emaste lindude puhul individuaalselt aastate vahel korduv. On ka näidatud, et plasma triglutseriidide tase peegeldab enamasti lühiajalisi kataboolseid protsesse, mitte pikaajalist konditsiooni (Jenni-Eiermann ja Jenni 1999). Seepärast peab olema ettevaatlik nende kahe tulemuse tõlgendamisel. Samas on emastel leitud seos viimase sigimisaasta ja TOS-i vahel ennustatud suunas – aasta enne kolooniast kadumist on TOS-i tase kõrgem kui keskmiselt populatsioonis. Kuna varasemad tööd on näidanud lindude sigimisedukuse järsku langust viimasel sigimisaastal (Rattiste 2004), võib oletada, et langeb ka lindude üldine konditsioon, millele viitab TOS-i väärtuse tõus. Kuna leitud seos põhineb vähestel andmetel ning vaid ühel aastal läbi viidud analüüsil, tuleks enne kindlamate järelduste tegemist seda analüüsi korrata.

Enamus uuritud oksüdatiivse seisundi parameetritest ei seostunud lindude vanusega ega ennustanud ka suremust. See tulemus on vastuolus mitmete uuringutega, mis on näidanud vanuse ning suremuse sõltuvust OS parameetritest nii tehistingimustes peetavates- (Devevey *et al.* 2010) kui vabalt elavates linnuasurkondades (Bize *et al.* 2008, Saino *et al.* 2011). Näiteks pikaajalisel linnuliigil, heleflamingol (*Phoenicopiterus ruber roseus*) Baseli loomaaias läbiviidud uurimus näitas paraboolset seost oksüdantide poolt indutseeritud vererakkude hemolüüsi aja ning lindude vanuse vahel. Kõrgeim vastupanu oksüdatiivsele stressile oli noortel täiskasvanud lindudel, vanuses 12-20 aastat, mis näitab, et vähemalt antud linnuliigi puhul areneb redokstasakaalu eest vastutav süsteem täielikult välja suguküpsuse saabumisel ning muutub seniliseerumise käigus ebaefektiivsemaks (Devevey *et al.* 2010). Kuigi ka käesolev uurimus on läbi viidud pikaajalisel linnuliigil, pole selles seoseid vere antioksidantide hulga ja vanuse vahel leitud. Üks põhjus selle jaoks on uurimuste erinev ülesehitus. Devevey ja teiste (2010) uurimus oli oma ülesehituselt läbilõikeline, mille puudusi longitudinaalanalüüside ees käsitleti juba eespool. Teiseks viidi see uuring läbi kunstlikes tingimustes elutseva asurkonna peal, mis küll minimaliseeris väliskeskkonna heterogeensusest tulenevat indiviidide vahelist varieeruvust (Devevey *et al.* 2010), samas võivad looduslikes asurkondades olla teistsugused valikusurved. Samuti ei mõõtnud antud uurimus kasutatud OS parameetri korduvust, seega ei saa kindel olla, kas kasutatud marker näitab antud liigi puhul pikaajalist fenotüübi kohasust või on see mõjutatav keskkonna lühiajaliste fluktrueerumiste poolt.

Longitudinaalne uuring suitsupääsukestel (*Hirundo rustica*) näitas, et sellel liigil ei esine seost plasma antioksidatiivse mahutavuse (*plasma antioxidant capacity* AOC) ja vanuse

vahel (Saino *et al.* 2011), küll aga ennustas AOC suremistõenäosust. Kasutatud biokeemilisel parameetril oli ka suur pesitsushooaja sisene ning aastatevaheline korduvus, mis näitab, et kõrgema AOC tasemega individid on seda kogu oma elu vältel. Seega on AOC vähemalt suitsupääsukeste puhul hea pikaajalise kohasuse näitaja. Erinevus käesoleva uurimuse ja Saino ja teiste (2011) uurimuse vahel võib tuleneda uurimisobjektide erinevatest elukäikudest. Suguküpsuse saavutanud suitsupääsukesel on suguküpsuse saavutanud kalakajakast väiksem keskmine eluiga. Kuna pikaeealisemad liigid on reeglina kaitstumad OS suhtes (Buttemer *et al.* 2010), on võimalik, et kalakajakal pikaeealise linnuliigina ei ole isegi surmaeelsel aastal redokstasakaalu säilitamisega probleeme. Samas leidis üks hiljutine uuring, et nii lühieelisel rasvatihasel (*Parus major*) kui pikemaeealisel suurpiiritajal (*Tachymarptis melba*) vähenes vananedes erütrotsüütide vastupanuvõime oksüdatiivsetele kahjustustele. Suurpiiritaja puhul leiti isegi, et toimub erütrotsüütide vastupanuvõime suurenemisele suunatud looduslik valik (Bize *et al.* 2014).

On ka võimalus, et mõõdetud redoksparameetrid ei peegelda kalakajaka puhul adekvaatselt isendite konditsiooni. Samas, kuna mitmed mõõdetud parameetritest olid individuaalselt aastate vahel korduvad, võib siiski eeldada, et mingi seos neil väärtustel linnu oksüdatiivse seisundiga siiski on. Võimalik on ka alternatiivne seletus, mille kohaselt organismi füsioloogia erinevad komponendid vananevad erineva kiirusega (Nussey *et al.* 2013), ja et kalakajakal toimub küll reproduktiivne vananemine kuid redokstasakaalu säilitamise mehhanismid ei vanane.

Selle hüpoteesi kinnitamiseks on kindlasti vajalikud täiendavad uuringud. Praeguses uuringus mõõdeti paljude antioksidantide tasemeid ning reaktiivsete osakeste koguhulka, kuid vaid paari oksüdatiivsete kahjustuste markerit. Paremaks arusaamaks redokstasakaalu säilitamise mehhanismidest on kindlasti tarvis mõõtmistesse kaasata rohkem oksüdatiivsete kahjustuste markereid. Ühe sellise markerina võib näiteks käsitleda kromosoomi otstes asetsevate mittekodeerivate kordusjärjestuste, telomeeride, pikkust. Oksüdatiivsete kahjustuste parandamine neis struktuurides on ebaefektiivsem kui ülejäänud DNAs (von Zglinicki 2002). Seepärast kiirendab oksüdatiivne stress telomeeride lühenemist. Telomeeride lühenemine kriitilise piirini võib põhjustada aga rakkude programmeeritud surma – apoptoosi (Beaulieu *et al.* 2011). Seega on telomeeride pikkus hea oksüdatiivse stressi kui ka organismi bioloogilise vananemise marker. Samuti on kasulik mõõta ka oksüdatiivse stressi poolt põhjustatud valkude ja lipiidide kahjustusi, kuna ka need rakukomponendid on oksüdatiivse stressi poolt haavatavad (Costantini *et al.* 2010).

Organismi redoksseisundi adekvaatseks hindamiseks on tarvis ka hinnata oksüdatiivsete

kahjustuste parandamise mehhanisme, kuid kuigi selliste mehhanismide mõõtmiseks on meetodeid välja töötatud (Fracasso *et al.* 2006), ei ole need ökoloogilistes uurimistöodes suurt kasutust leidnud (Monaghan *et al.* 2009). Tulevastesse uuringutesse võiks seepärast kaasata lisaks antioksidantide tasemele, reaktiivsete osakeste hulga ja oksüdatiivsete kahjustuste markeritele ka mõne oksüdatiivsete kahjustuste parandusmehhanismi mõõdu, alles siis saab kindlusega öelda, et mõõdeti redokstasakaalu säilitamise efektiivsust ning seda, kas see vanusest sõltuvalt halveneb.

Mitmed uuringud on lindudel näidanud seoseid oksüdatiivse stressi biokeemiliste parameetrite ja sigimisedukuse vahel (Safran *et al.* 2010, Marko *et al.* 2011). Käesolevas uuringus mõõdeti vaid kahte sigimisedukuse parameetrit (munemise algusaeg ja kurna mass) ning nende seoseid oksüdatiivse stressi biokeemiliste parameetritega ei uuritud. Tulevikus saab käesoleva töö raames kogutud andmete põhjal uurida ka selliseid seoseid. Samuti on võimalik võrrelda uuritud lindude ja nende sigimisealiste järglaste vahelist biokeemiliste kohasusemarkerite korduvust, tuvastamaks võimalikku redokstasakaalu säilitamise mehhanismide päritavust.

5. Kokkuvõte

Oksüdatiivne stress tekib, kui reaktiivse osakeste tootmine ületab nende mõju neutraliseerivate süsteemide võimekuse. Selline olukord viib biomolekulide kahjustumiseni, mis võib häirida rakufunktsioone ja põhjustada isegi surma (Halliwell ja Gutteridge 2007).

Oksüdatiivse stressi vältimine on seepärast organismi tervise seisukohalt hädavajalik. Organismi optimaalne elukäik võib seetõttu sõltuda ressursside paigutamisest oksüdatiivse stressi vastu võitlemise ja teiste elukäigutunnuste vahel. Oksüdatiivset stressi peetakse ka organismi vananemise põhjustajaks (Harman 1956). Vaatamata sellele ei ole oksüdatiivse stressi mõju vananemisele paljude, eriti aga pikaajaliste taksonite puhul uuritud (Costantini *et al.* 2010).

Kalakajakas (*Larus canus*) on koloniaalne pikaajaline lind, kelle puhul on varasemates töödes reproduktiivset vananemist näidatud (Rattiste 2004). Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli leida, kas kalakajal esineb vananemist ka oksüdatiivse staatuse ja kohasuse biokeemilistes markerites. Töö teiseks eesmärgiks on valitud markerite individuaalse korduvuse mõõtmise läbi kindlaks teha, kas need on sobilikud pikaajalise konditsiooni kirjeldamiseks.

Uuritud biokeemilistest tervisenäitajatest enamik ei olnud seoses ei vanuse ega suremusega, mis on vastuolus paljude teiste uurimustega (Bize *et al.* 2008, Devevey *et al.* 2010, Saino *et al.* 2011). Leiti vaid seos triglütseriidide taseme ja vanuse ning plasma oksüdatiivse staatuse ja suremuse vahel, kuid need seosed on metoodilistel põhjustel raskesti tõlgendatavad. Samas oli valimis märgatav reproduktiivne vananemine. Biokeemilistest markeritest esines individuaalne korduvus karotenoidide ja kusihaappe kontsentratsioonides. Korduvuse täpsete põhjuste väljaselgitamise jaoks on aga tarvilikud täiendavad uuringud.

Kuna biokeemilised kohasusemarkerid vananemist ega suremust ette ei ennustanud, on võimalik, et kalakajaka redokstasakaalu säilitamise eest vastutvad mehhanismid ei vanane. Antud hüpoteesi kindlamaks tõestamiseks on tarvilik täiendavalt läbi viia rohkemaid biokeemilisi markereid kaasavaid uuringuid.

6. Summary

Variation in the markers of oxidative stress in the common gull (*Larus canus*): associations with age and mortality

Oxidative stress arises, when the production of reactive species overwhelms the mechanisms responsible for their neutralisation. That kind of a situation leads to biomolecular damage, that could damage cell functions and cause even death (Halliwell and Gutteridge 2007).

For that reason avoiding oxidative stress is crucial for maintaining organismal health. Optimal life history of an organism can therefore depend upon the allocation of resources between life history traits and fighting oxidative stress. Oxidative stress is also considered to be the cause of senescence (Harman 1956). Despite that notion the effect of oxidative stress on senescence still remains poorly studied, especially on long-living organisms (Costantini *et al.* 2010).

The common gull (*Larus canus*) is a colonial long-living seabird, on whom previous studies have shown proof of reproductive senescence (Rattiste 2004). The aim of this thesis was to find out if there are also marks of senescence in the common gulls' biochemical markers of oxidative status and fitness. The second aim of this thesis is to measure individual repeatability of the selected markers to find out if they are suitable for measuring long term fitness of an individual.

None of the biochemical healthmarkers predicted senescence nor death, which contradicts the results of many other studies (Bize *et al.* 2008, Devevey *et al.* 2010, Saino *et al.* 2011). However there was proof of reproductive senescence in the sample. Individual consistency was found in two of the biochemical condition markers: carotenoids and uric acid. The reasons for this however demand further study.

Because none of the biochemical markers of fitness predicted neither senescence nor death, there is a possibility, that in common gull the mechanisms responsible for maintaining oxidative balance do not age. For the definitive proof of this hypothesis, however further studies incorporating more biochemical markers of fitness are needed.

7. Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat, Tuul Seppa igakülgse abi eest. Samuti oma töörühma juhti, Peeter Hõrakut, Kalev Rattist et Eesti Maaülikoolist. Tänan ka Lauri Saksa, Ulvi Karu ja Elin Silda, kes olid abiks biokeemiliste analüüside teostamisel, Ants Kaasikut ja Richard Meiterni, kes olid abiks andmete analüüsimisel, ja kõiki loomaökoloogia õppetooli liikmeid, kes mind oma konstruktiivse kriitikaga aitasid.

8. Kirjandus

- Alonso-Alvarez, C., L. Perez-Rodriguez, J. T. Garcia, J. Vinuela and R. Mateo (2010). "Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species." Physiological and Biochemical Zoology **83**: 110-118.
- Beaulieu, M., S. Reichert, Y. Le Maho, A. Ancel and F. Criscuolo (2011). "Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event." Functional Ecology **25**: 577-585.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiological Reviews **78**: 547-581.
- Bize, P., S. Cotting, G. Devevey, J. van Rooyen, F. Lalubin, O. Glaizot and P. Christe (2014). "Senescence in cell oxidative status in two bird species with contrasting life expectancy." Oecologia **174**: 1097-1105.
- Bize, P., G. Devevey, P. Monaghan, B. Doligez and P. Christe (2008). "Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird." Ecology **89**: 2584-2593.
- Brommer, J. E., K. Rattiste and A. Wilson (2009). "The rate of ageing in a long-lived bird is not heritable." Heredity **104**: 363-370.
- Buttemer, W. A., D. Abele and D. Costantini (2010). "From bivalves to birds: oxidative stress and longevity." Functional Ecology **24**: 971-983.
- Carlos Noguera, J., S.-Y. Kim and A. Velando (2012). "Pre-fledgling oxidative damage predicts recruitment in a long-lived bird." Biology Letters **8**: 61-63.
- Costantini, D. (2011). "On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid." Methods in Ecology and Evolution **2**: 321-325.
- Costantini, D., M. Rowe, M. W. Butler and K. J. McGraw (2010). "From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology." Functional Ecology **24**: 950-959.
- Devevey, G., N. Bruyndonckx, F. von Houwald, A. Studer-Thiersch and P. Christe (2010).

"Age-specific variation of resistance to oxidative stress in the greater flamingo (*Phoenicopterus ruber roseus*)." Journal of Ornithology **151**: 251-254.

Dowling, D. K. and L. W. Simmons (2009). "Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **276**: 1737-1745.

Erel, O. (2004). "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation." Clinical Biochemistry **37**: 277-285.

Erel, O. (2005). "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status." Clinical Biochemistry **38**: 1103-1111.

Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radical Biology and Medicine **11**: 81-128.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**: 239-247.

Fracasso, M. E., D. Doria, P. Franceschetti, L. Perbellini and L. Romeo (2006). "DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace." Toxicology Letters **167**: 131-141.

Freitas, M., J. L. F. C. Lima and E. Fernandes (2009). "Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review." Analytica Chimica Acta **649**: 8-23.

Galvan, I. and C. Alonso-Alvarez (2008). "An Intracellular Antioxidant Determines the Expression of a Melanin-Based Signal in a Bird." Plos One **3**.

Garratt, M. and R. C. Brooks (2012). "Oxidative stress and condition-dependent sexual signals: more than just seeing red." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **279**: 3121-3130.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (2007). Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford.

- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." Journal of gerontology **11**: 298-300.
- Hartman, S., S. A. Taleb, T. Geng, K. Gyenai, X. Guan and E. Smith (2006). "Comparison of plasma uric acid levels in five varieties of the domestic turkey, *Meleagris gallopavo*." Poultry Science **85**: 1791-1794.
- Hill, G. E. and J. D. Johnson (2012). "The Vitamin A-Redox Hypothesis: A Biochemical Basis for Honest Signaling via Carotenoid Pigmentation." American Naturalist **180**: E127-E150.
- Hörak, P. and A. Cohen (2010). "How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues." Functional Ecology **24**: 960-970.
- Hörak, P., L. Saks, I. Ots and H. Kollist (2002). "Repeatability of condition indices in captive greenfinches (*Carduelis chloris*)." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **80**: 636-643.
- Jacobsen, D. W. (2000). "Hyperhomocysteinemia and oxidative stress - Time for a reality check?" Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **20**: 1182-1184.
- Jenni-Eiermann, S. and L. Jenni (1999). "What can plasma metabolites tell us about the metabolism, physiological state and condition of individual birds? An overview." Biologia e Conservazione della Fauna **102**: 312-319.
- Losdat, S., F. Helfenstein, J. D. Blount, V. Marri, L. Maronde and H. Richner (2013). "Nestling erythrocyte resistance to oxidative stress predicts fledging success but not local recruitment in a wild bird." Biology Letters **9**.
- Marko, G., D. Costantini, G. Michl and J. Toeroek (2011). "Oxidative damage and plasma antioxidant capacity in relation to body size, age, male sexual traits and female reproductive performance in the collared Xycatcher (*Ficedula albicollis*)." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **181**: 73-81.
- McGraw, K. J., A. A. Cohen, D. Costantini and P. Hörak (2010). "The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a marriage between mechanistic and functional perspectives." Functional Ecology **24**: 947-949.

- Meitern, R., E. Sild, K. Kilk, R. Porosk and P. Hõrak (2013). "On the methodological limitations of detecting oxidative stress: effects of paraquat on measures of oxidative status in greenfinches." Journal of Experimental Biology **216**: 2713-2721.
- Metcalf, N. B. and C. Alonso-Alvarez (2010). "Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death." Functional Ecology **24**: 984-996.
- Monaghan, P., N. B. Metcalfe and R. Torres (2009). "Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation." Ecology Letters **12**: 75-92.
- Nakagawa, S. and H. Schielzeth (2010). "Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists." Biological Reviews **85**: 935-956.
- Niki, E. (2009). "Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects." Free Radical Biology and Medicine **47**: 469-484.
- Nussey, D. H., H. Froy, J. F. Lemaitre, J. M. Gaillard and S. N. Austad (2013). "Senescence in natural populations of animals: Widespread evidence and its implications for biogerontology." Ageing Research Reviews **12**: 214-225.
- Nussey, D. H., J. M. Pemberton, J. G. Pilkington and J. D. Blount (2009). "Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population." Functional Ecology **23**: 809-817.
- Rahman, I., A. Kode and S. K. Biswas (2006). "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method." Nature Protocols **1**: 3159-3165.
- Rattiste, K. (2004). "Reproductive success in presenescent common gulls (*Larus canus*): the importance of the last year of life." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **271**: 2059-2064.
- Rattiste, K. and V. Lilleleht (1995). "Survival rates of breeding comon gulls in Estonia." Journal of Applied Statistics **22**: 1057-1062.
- Rattiste, K. and U. Tartes (2005). "Long-term studies of common gulls (*Larus canus*) in Estonia: responses to environmental conditions." Acta Zoologica Lituonica **15**: 158-160.

- Romero-Haro, A. A. and C. Alonso-Alvarez (2014). "Covariation in oxidative stress markers in the blood of nestling and adult birds." Physiological and biochemical zoology : PBZ **87**: 353-362.
- Safran, R. J., K. J. McGraw, M. R. Wilkins, J. K. Hubbard and J. Marling (2010). "Positive Carotenoid Balance Correlates with Greater Reproductive Performance in a Wild Bird." Plos One **5**.
- Saino, N., M. Caprioli, M. Romano, G. Boncoraglio, D. Rubolini, R. Ambrosini, A. Bonisoli-Alquati and A. Romano (2011). "Antioxidant Defenses Predict Long-Term Survival in a Passerine Bird." Plos One **6**.
- Salomons, H. M., G. A. Mulder, L. van de Zande, M. F. Haussmann, M. H. K. Linskens and S. Verhulst (2009). "Telomere shortening and survival in free-living corvids." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **276**: 3157-3165.
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annual Review of Entomology. Palo Alto, Annual Reviews. **50**: 529-551.
- Selman, C., J. D. Blount, D. H. Nussey and J. R. Speakman (2012). "Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now?" Trends in Ecology & Evolution **27**: 570-577.
- Sepp, T., E. Sild, J. D. Blount, M. Männiste, U. Karu and P. Hõrak (2012). "Individual Consistency and Covariation of Measures of Oxidative Status in Greenfinches." Physiological and Biochemical Zoology **85**: 299-307.
- Sepp, T., E. Sild and P. Hõrak (2010). "Hematological Condition Indexes in Greenfinches: Effects of Captivity and Diurnal Variation." Physiological and Biochemical Zoology **83**: 276-282.
- Svensson, P. A. and B. B. M. Wong (2011). "Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review." Behaviour **148**: 131-189.
- Tsahar, E., Z. Arad, I. Izhaki and C. G. Guglielmo (2006). "The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **176**: 653-661.

- Tummeleht, L., M. Mägi, P. Kilgas, R. Mänd and P. Hõrak (2006). "Antioxidant protection and plasma carotenoids of incubating great tits (*Parus major* L.) in relation to health state and breeding conditions." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **144**: 166-172.
- von Schantz, T., S. Bensch, M. Grahn, D. Hasselquist and H. Wittzell (1999). "Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **266**: 1-12.
- von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." Trends in Biochemical Sciences **27**: 339-344.
- Voss, P. and W. Siems (2006). "Clinical oxidation parameters of aging." Free Radical Research **40**: 1339-1349.
- Wright, P. A. (1995). "Nitrogen-excretion - 3 end-products, many physiological roles." Journal of Experimental Biology **198**: 273-281.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Janek Urvik

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Oksüdatiivse seisundi markerite varieeruvus kalakajakal (*Larus canus*): seosed vanuse ja suremusega

mille juhendaja on PhD Tuul Sepp

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **26.05.2014**